

Darstellung von
Fibrin- und / oder Fibrinogenabbauprodukten
im Plasma durch PAA-Gelelektrophorese
und Intra-Gel-Immunpräzipitation

Klaus Wreschniok

1972

Aus der I. Frauenklinik der Universität München

Direktor: Prof. Dr. med. Josef Zander

DARSTELLUNG VON FIBRIN- UND/ODER FIBRINOGENABBAUPRODUKTEN
IM PLASMA DURCH PAA-GELELEKTROPHORESE UND
INTRA-GEL-IMMUNPRÄZIPITATION

I N A U G U R A L - D I S S E R T A T I O N

zur Erlangung der Doktorwürde in der gesamten Medizin
verfaßt und einer Hohen Medizinischen Fakultät
der Ludwig Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von
Klaus Wreschniok

aus
Heidelberg

- 1 9 7 2 -



Dekan : Prof. Dr. med. W. Spann

Referent: Priv.-Doz. Dr. med. H. Graeff

Doktor-Prüfung am 5.12.72

INHALTSVERZEICHNIS

	Seite
A) EINLEITUNG	1
B) MATERIAL UND METHODEN	2 - 7
1.) PAR-MATERIAL VERFÜGBAR	2
2.) ZURICH-101-IMMUNOPHÄNITIS	3 - 4
3.) VERGLEICHSGRUPPE	4 - 5
4.) VERGLEICHSGRUPPE MIT KONTAKT	5
5.) IN EINER VERGLEICHSGRUPPE	6 - 7
6.) IN EINER VERGLEICHSGRUPPE MIT KONTAKT	7 - 8
7.) IN EINER VERGLEICHSGRUPPE MIT KONTAKT	8
C) ERGEBNISSE	9 - 18
1.) IN EINER VERGLEICHSGRUPPE MIT KONTAKT	9 - 10
2.) IN EINER VERGLEICHSGRUPPE MIT KONTAKT	10 - 15
3.) VERGLEICHSGRUPPE MIT KONTAKT	15 - 18
D) DISKUSION	19 - 20
E) ZUSAMMENFASSUNG	21
F) LITERATURVERWEISUNG	22 - 23
G) ANHANG	24

I n h a l t s v e r z e i c h n i s

Seite

A) EINLEITUNG	1
B) MATERIAL UND METHODEN	2 - 7
1.) PAA-Gelelektrophorese	2
2.) Intra-Gel-Immunpräzipitation	3 - 4
3.) Reinigungsverfahren	4 - 5
4.) Molekulargewichtsabschätzung	6
5.) <u>In vitro</u> Versuche	6 - 7
I. <u>In vitro</u> Versuche mit gereinigtem Fibrinogen	6 - 7
II. <u>In vitro</u> Versuche mit Plasma	7
C) ERGEBNISSE	8 - 19
1.) <u>In vitro</u> Versuche mit gereinigtem Fibrinogen	8 - 9
2.) <u>In vitro</u> Versuche mit Plasma	10 - 15
3.) Befunde bei Plasmaproben von Patientinnen	16 - 19
D) DISKUSSION	20 - 22
E) ZUSAMMENFASSUNG	23
F) LITERATURVERZEICHNIS	24 - 26
G) LEBENSLAUF	27

A) EINLEITUNG

Das Auftreten von Fibrinogenderivaten im Plasma ist bei Fällen von disseminierter intravaskulärer Gerinnung (DIC) und primärer Fibrinogenolyse von diagnostischer Bedeutung. Diese Störungen des Gerinnungssystems treten gehäuft in der Schwangerschaft auf, wobei sowohl die Mutter als auch das Kind betroffen sind. Bei der Untersuchung fetaler Blutproben sind Versuchsanordnungen, die weniger als 0,1 ml Plasma benötigen, vorteilhaft.

Mit Hilfe der Polyacrylamidgelelektrophorese (PAA-Gelelektrophorese) kann in reproduzierbarer Weise eine Trennung von Plasmaproteinen aufgrund ihrer elektrophoretischen Beweglichkeit und ihrer Molekulargewichte erreicht werden (ORNSTEIN, 1964; DAVIS, 1964). Fibrin- und/oder Fibrinogenabbauprodukte wurden durch Intragel-Immünpräzipitation mit monovalenten Antisera (KRIEG und WEICKER, 1970) direkt im Gel als FR-Antigen (Protein, das sich immunologisch wie Fibrinogen verhält) nachgewiesen.

B) MATERIAL UND METHODEN

1.) Die PAA-Gelelektrophorese

Die Trennung von Plasmaproteinen wurde durch Polyacrylamidgelelektrophorese (PAA-Gelelektrophorese) (ORNSTEIN, 1964; DAVIS, 1964) in 7 %-igem PAA-Gel erreicht wie sie von Maurer (1968) beschrieben wurde (S. 42; 7 %-iges Trenngel pH 8,9; Sammelgel pH 6,9; Glycin-Elektrodenpuffer pH 8,3).

Alle verwendeten chemischen Stoffe waren analysenrein und wurden von Serva (Heidelberg, BRD) (No. 39026, Satz DC-II) geliefert. Die Elektrophorese wurde mit einem Desaga (Heidelberg, BRD) Flachgelelektrophoresegerät ausgeführt. Durch eine 0,001 %-ige Bromphenolblaulösung wurde die Wanderungszone markiert.

Die Elektrophorese wurde unter konstanter Stromzufuhr von 25 mA begonnen. Nachdem der Farbstoff das Trenngel erreicht hatte, wurde die Stromstärke auf eine konstante Zufuhr von 50 mA erhöht. Beendet wurde die Elektrophorese, sobald die Albuminfraktion das untere Ende der Gelkammer erreicht hatte oder - anders ausgedrückt - 25 Minuten nachdem die Farblinie das untere Ende des Gels überschritten hatte.

2.) Immunpräzipitation

Das Anti-Fibrinogen-Serum vom Kaninchen (No. RCH 04) und das fluoreszinmarkierte Anti-Fibrinogen-Serum vom Kaninchen (No. TKE 04) wurden über die Behringwerke, Marburg, BRD, bezogen. Monovalente Anti-D und Anti-E Sera wurden freundlicherweise von Dr. Heimbürger (Behringwerke) zur Verfügung gestellt. Für die Intra-Gel-Immunpräzipitation von FR-Antigen wurden zwei Gele in einen 80 x 80 x 30 mm großen Plastikbehälter gelegt, dann 2 ml Antiserum und 8 ml TES-Puffer (pH 7,5, Ionenstärke 0,15) (BELLER und GRAEFF, 1970) hinzugefügt und anschließend der Behälter 48 Stunden lang ununterbrochen gleichmäßig bewegt. Danach konnte man den Großteil der Immunpräzipitationen mit dem bloßen Auge erkennen.

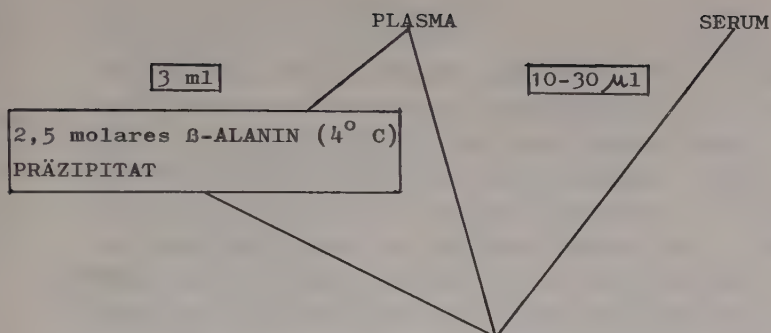
Für die Entproteinisierung wurden die Gele locker mit einem Dialysierschlauch (Typ 27/32, Visking) auf einem Plastikrahmen befestigt. Der Rahmen wurde dann in ein Entfärbebad (Desaga, Heidelberg, BRD) gelegt, welches mit einem Liter kalter Tris-Glycin-Pufferlösung gefüllt war (Stammlösung: 2,5 g Tris + 1,0 g Glycin auf 100 ml destilliertes Wasser, pH 9,15; Gebrauchslösung: 1 : 1000, pH 8,8; (KRIEG und WEICKER, 1970)). Die Stromzufuhr wurde konstant bei 9 mA gehalten. Der auftretende Spannungsabfall kann wahrscheinlich auf die ausgewaschenen Proteine zurückgeführt werden (KRIEG und WEICKER, 1970).

Immer, wenn die Voltzahl auf 100 Volt oder weniger abfiel, wurde die Pufferlösung gewechselt (bis zu 16 mal). Bei jedem Wechsel wurden das Gel und die Dialysiermembran mit destilliertem Wasser abgespült. Nach 24 oder 36 Stunden war das Gel gewöhnlich frei von nicht präzipitierten Proteinen. Die Präzipitationsbanden wurden dann eine Stunde lang mit Amidoschwarz 10 B gefärbt. Danach wurden die Gele elektrophoretisch in 0,7 %-iger Essigsäurelösung bei 200 mA entfärbt und schließlich photographisch festgehalten.

3.) Reinigungsverfahren

Fibrinogen und seine Derivate wurden im Plasma nach einer Abwandlung der Methode von Straughn und Wagner (1966) präzipitiert. Zu Normalplasma, zu lysierten Plasmagerinnseln, zu Mischungen beider und zu Plasmaproben von Patientinnen wurde bei 4° C kristallines β -Alanin (Nr. 11491, Serva) bis zu einer Endkonzentration von 2,5 bzw. 4 M zugegeben. Die Probe wurde dann im Eisbad 30 Minuten lang vorsichtig umgerührt. Nachdem das Präzipitat bei 9000 g (4° C, 20 Minuten) abzentrifugiert worden war, wurde der Überstand abgegossen und das zusammengepreßte Präzipitat in der Hälfte des Ausgangsvolumens wieder aufgelöst. Dazu verwandte man TES-Citrat-Tryslol-Puffer und rührte das Gemisch 30 Minuten lang bei Zimmertemperatur um. Der Puffer enthielt 1 Teil (3,75 g Natriumcitrat + 1,38 g TES/10 ml Tryslol (Bayer, Leverkusen, BRD) (10.000 KIU/ml) auf 100 ml destilliertes Wasser, pH 7,5) und 9 Teile (TES-Puffer, pH 7,5; Ionenstärke 0,15 (BELLER und GRAEFF, 1970)) mit Merthiolat in einer Endkonzentration von 1 : 10.000 als Zusatz.

Tabelle 1 zeigt eine schematische Darstellung des gesamten Arbeitsganges.



- 1.) POLYACRYLAMID-GELELEKTROPHORESE
7 % GEL; ELEKTRODENPUFFER pH 8,3;
SAMMELGEL pH 6,7; TRENNGEL pH 8,9

- 2.) IMMUNDIFFUSION
2 ml ANTI-FIRINOGEN-SERUM + 8 ml TES PUFFER/GEL
(45 mm/40 mm/ 3 mm)
48 h, 22° C, BEI KONSTANTEM SCHÜTTELN

- 3.) ENTPROTEINISIEREN
TRIS-GLYCIN-PUFFER, pH 8,8, 0,0004 molar, 9 mA.

- 4.) FÄRBEN
AMIDOSCHWARZ 10 B

- 5.) ENTFÄRBEN
200 mA, 0,7 % ESSIGSÄURE

Tab. 1: Schematische Darstellung des Arbeitsganges

4.) Molekulargewichtsabschätzung

Die Molekülgröße von Fibrinogenabbauprodukten wurde durch eine zweidimensionale Elektrophorese in PAA-Gelen gleicher (7%/7%) und unterschiedlicher (5%/7%) Porengröße relativiert (RAYMOND, 1968). Außerdem wurde eine PAA-Gelelektrophorese bei gleichzeitiger Verwendung von Natrium Dodecyl Sulfat (NDS) gemäß der Methode von Shapiro und Mitarbeitern (1964) durchgeführt, wobei auf die Zugabe von β -Mercapto-Ethanol zur Darstellung von Einzelketten verzichtet wurde.

5.) In vitro Versuche

Alle Versuche wurden bei einer Temperatur von 37° C (Wasserbad) durchgeführt. Durch Zugabe von 100 KIU/ml Trasylol (Bayer) wurde die Lyse gestoppt.

I.) In vitro Versuche mit gereinigtem Fibrinogen

- a) Zu 1 ml einer 1 %-igen Lösung von Humanfibrinogen (Behringwerke, Marburg, OP.031170) wurden 0,1 ml (0,125 KU/ml) Plasmin (FPHL in Glycerol gelöst, Kabi, Stockholm, Schweden) und 0,4 ml TES-Puffer zugegeben und sorgfältig gemischt. Nach 20 Minuten und nach 24 Stunden wurde die lytische Aktivität durch Trasylolzugabe unterbrochen.
- b) Aus 1 ml einer 1 %-igen Humanfibrinogenlösung, 0,1 ml aktiviertem Faktor XIII (siehe unten), 0,1 ml Plasmin (in der selben Konzentration wie bereits oben erwähnt) und 0,1 ml (6NIH-Einheiten) Thrombin (RHT 18 bovin, Behringwerke, Marburg), wurde ein Gerinnsel gebildet. Nach ca. 35 Minuten setzte die Auflösung des Gerinnsels ein. Nach zusätzlichen 35 Minuten (=Auflösungszeit + 100 %) wurde die Lyse gestoppt.

Aktivierung von Faktor XIII: Zu 1 ml gereinigtem Faktor XIII (Nr. 1331, Behringwerke, Marburg) wurden 3 ml TES-Puffer, 1 ml 0,025 molares CaCl_2 und 3 ml Thrombin (20 NIH-Einheiten) hinzugefügt. Die Mischung wurde dann 3 Minuten lang bei einer Temperatur von 37°C inkubiert.

II.) In vitro Versuche mit Plasma

0,06 ml (200u/ml) Streptokinaselösung (OBSK 0405 Behringwerke, Marburg), 0,1 ml CaCl_2 (0,025 molar) und 0,1 ml Thrombin (6 NIH-Einheiten) wurden zu 1 ml Citratplasma hinzugefügt. Die Auflösungszeit des Gerinnsels wurde auf 35 Minuten festgesetzt. Nach zusätzlichen 35 Minuten (=Auflösungszeit + 100 %) wurde die Lyse gestoppt. Bei der Mischung von Normalplasma und gelöstem Plasmagerinnsel wurde TAME (Nr. 8334, Merck, Darmstadt, BRD) zugegeben. Im Bedarfsfall wurden die Proben bei einer Temperatur von -25°C gelagert.

Die Konzentration von FR-Antigen in gereinigter Lösung und in Plasma und Serum wurde mit Hilfe der radialen Immundiffusion (MANCINI und Mitarbeiter) bestimmt, wobei man Partigen-Fibrinogen Platten (OTDP 0203, Behringwerke, Marburg) verwandte. Die Gerinnbarkeit wurde anhand der Thrombinzeitbestimmung geprüft (KUHN und GRAEFF, 1970).

C) ERGEBNISSE

1.) In vitro Versuche mit gereinigtem Fibrinogen

Um einige Daten über das Verteilungsschema von Fibrin/Fibrinogen Abbauprodukten zu erhalten, wurden Versuche mit gereinigtem Fibrinogen durchgeführt. Die fortschreitende Proteolyse von Fibrinogen oder eines Fibringerinnsels wurde jeweils nach einem größeren Zeitabstand unterbrochen. Fibrin/Fibrinogen Abbauprodukte der Stadien 1,2 und 3 (MARDER, 1971) konnten identifiziert werden (Abb. 1). Die nach verlängerter Inkubationszeit auftretenden Abbauprodukte wurden mit monovalentem Anti-D bzw. Anti-E Antiserum immunpräzipitiert (Abb. 1).

Der Abbau eines durch aktivierten Faktor XIII stabilisierten Fibringerinnsels ergab nach einer zusätzlichen Inkubation von 100 % der Lysezeit eine Reihe von Banden (Abb. 1). Zwei Banden, die anodenwärts des Fibrinogens wanderten, konnten identifiziert werden. Außerdem sah man eine Bande knapp über der Fibrinogenwanderungszone und eine weitere in der Nähe der Grenzlinie des Gels. Nach der zweidimensionalen Elektrophorese in Gelen derselben Porengröße ergab sich eine diagonale Anordnung der Fibrinabbauprodukte. Die zweidimensionale Elektrophorese in Gelen verschiedener Porengröße und die Elektrophorese unter gleichzeitiger Verwendung von NDS machte bei der Komponente, die kathodenwärts des Fibrinogens wanderte, ein größeres Molekulargewicht als das des Fibrinogens wahrscheinlich.

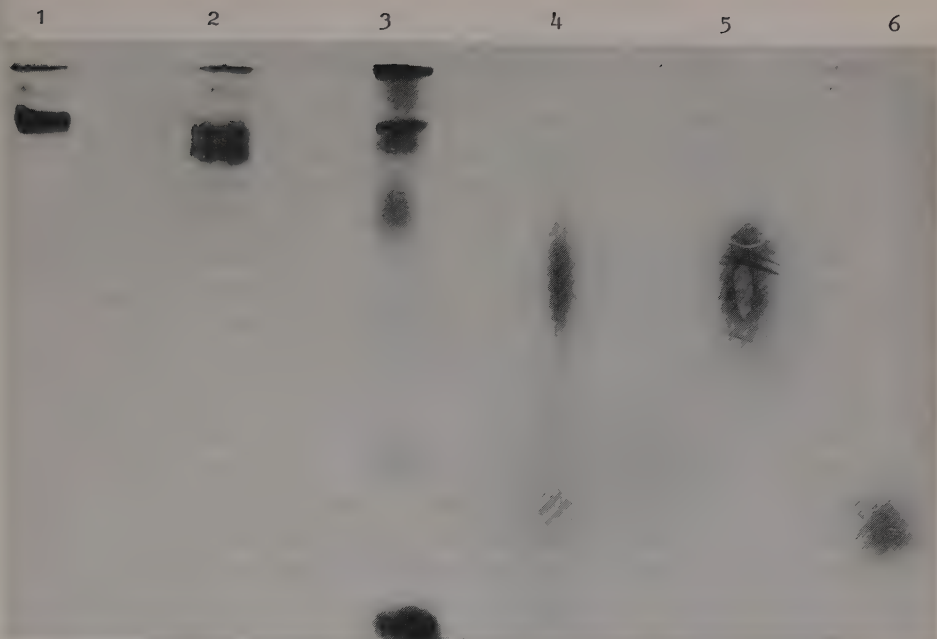


Abb. 1: PAA-Gelelektrophorese von Plasminabbauprodukten des Fibrinogens und Fibrins.

Die Kathode ist oben, die Anode unten angebracht. Ganz links ist Fibrinogen als Bezugsbande aufgezeigt (1).

Der nächste Versuch zeigt die Stadien 1 und 2 der Abbauprodukte der Fibrinogenolyse (2).

Der dritte Versuch zeigt die Abbauprodukte eines stabilisierten Fibringerinnsels (3).

Man beachte die Bande knapp oberhalb der Fibrinogenwanderungszone und eine andere Bande nahe der Grenzlinie des Gels. Die Bande in der Nähe des unteren Randes des Gels ist eine Albuminverunreinigung. Die Abbauprodukte des Stadiums 3 der Fibrinogenolyse wurden mit Anti-Fibrinogen (4), Anti-D (5) und Anti-E (6) Antiserum präzipitiert.

2.) In vitro Versuche mit Plasma

Nach der PAA-Gelelektrophorese mit Normalplasma konnte man ein ganz bestimmtes Verteilungsmuster der Plasmaproteine sehen.

β -Lipoprotein, α_2 -Makroglobulin, Transferrin und Albumin waren leicht zu erkennen und ermöglichten deshalb eine Orientierung auf dem Gel (siehe Abb. 2). Nach der Immunpräzipitation wurde das Fibrinogen von einer einzelnen Bande angezeigt, welche ein wenig kathodenwärts des α_2 -Makroglobulins wanderte (siehe Abb. 2). Waren mehr als 3 ml Plasma vorhanden, so wurden Fibrinogen und seine Derivate durch β -Alaninzugabe ausgesalzen. Dabei blieben fast alle übrigen Plasmaproteine im Überstand. Das Präzipitat zeigte nur eine geringgradige Verunreinigung durch α_2 -Makroglobulin, Transferrin und Albumin. Nach diesem Verfahren konnte man daher das Fibrinogen ohne zusätzliche Immunpräzipitation identifizieren. Im Normalplasma gingen weniger als 10 % des Fibrinogengehaltes im Überstand verloren. Eine Wiederholung der Präzipitation mit 2,5 molarem β -Alanin oder die Anwendung von 2,5 oder 4,5 molaren β -Alanin Fällungen brachten verglichen mit dem angewandten 2,5 molaren Präzipitationsverfahren keinerlei Vorteile (Abb. 3).

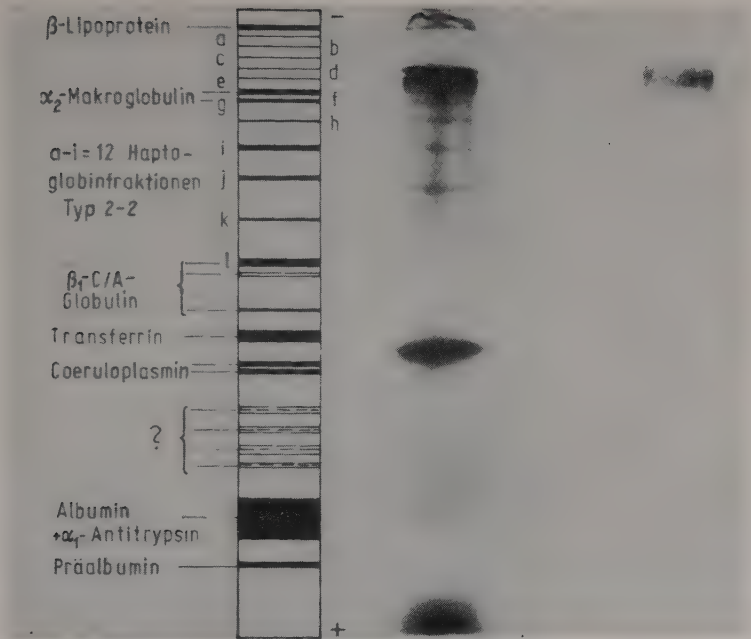


Abb. 2: Auf der linken Seite der Abbildung ist (entsprechend zu KRIEG und WEICKER, 1970) die Verteilung der Plasmaproteine nach einer PAA-Gelelektrophorese aufgezeigt. Auf der rechten Seite sieht man die Trennung eines Normalplasmas. Nach der Immunpräzipitation (ganz rechts) wird Fibrinogen durch eine einzelne Bande, die kurz unterhalb des α_2 -Makroglobulins läuft, dargestellt.

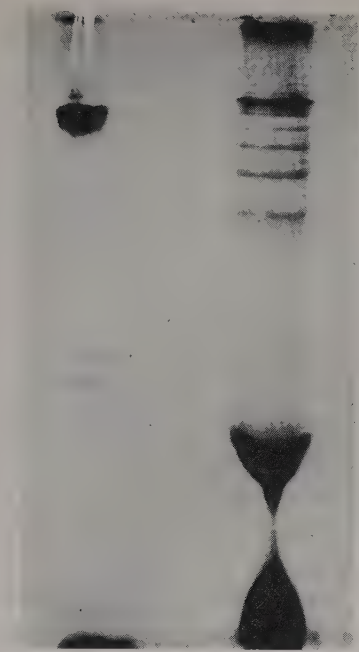


Abb. 3: Das Präzipitat (rechts) und der Überstand (links) eines Normalplasmas nach einer Fällung mit 2,5 molarem β -Alanin.

Die Auflösung von stabilisierten Plasmagerinnselflockungen wurde durch Streptokinase eingeleitet. Man ließ die Proteolyse entsprechend der Lösungszeit (Lösungszeit + 100 %) fortschreiten. Diese Proben unterzog man dann ebenfalls einer 2,5 molaren β -Alanin Fällung. Abbildung 4 zeigt das Verteilungsmuster eines Normalplasmas, eines aufgelösten Plasmagerinnselflocks sowie einer Mischung bestehend aus einem aufgelösten Gerinnsel und einem Normalplasma. Die Komponente, welche kathodenwärts des Fibrinogens wanderte, wurde durch Immunpräzipitation als FR-Antigen identifiziert. Letztere Probe wurde einer zweidimensionalen Elektrophorese in Gelen verschiedener Porengröße unterzogen. Die Konzentration des Gels in der ersten Trennrichtung war 5 %, in der zweiten 7 %. Nach der Wanderung im kleinporigen Gel erreichte die Komponente, welche kathodenwärts des Fibrinogens wanderte, nicht die Linie zwischen dem Fibrinogen und dem Ausgangspunkt (Abb. 5). Dies wies darauf hin, daß ihr Wanderungsverhalten hauptsächlich von ihrer Molekulargröße abhing, welche deshalb größer als die des Fibrinogens sein mußte. Eine Elektrophorese unter Verwendung von NDS bestärkte diese Feststellung.

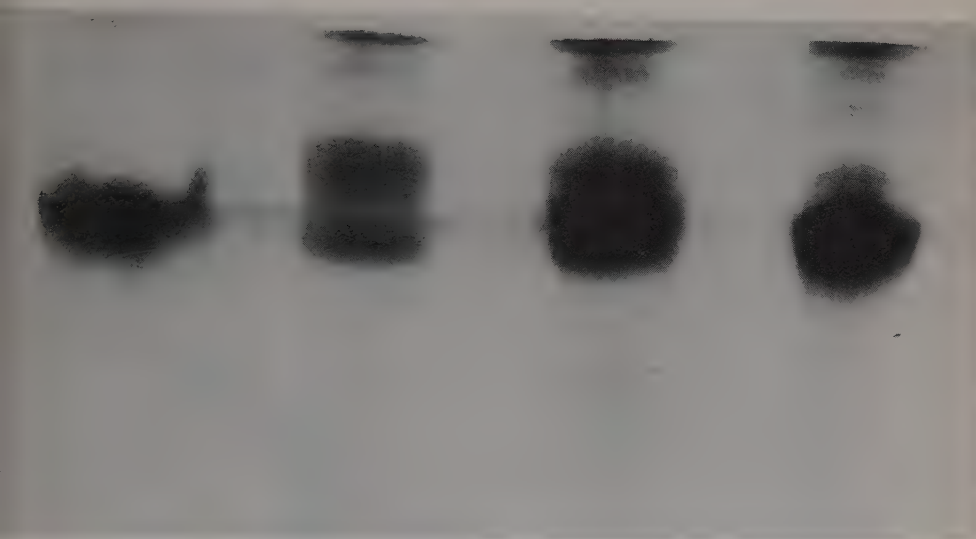


Abb. 4: PAA-Gelelektrophorese eines 2,5 molaren β -Alanin Präzipitats eines Normalplasmas (erster Lauf), eines gelösten Plasmagerinnsels (zweiter Lauf), einer Mischung dieser beiden (dritter Lauf) und des Plasmas einer Patientin, bei der ein Endotoxinschock mit DIC vorlag (vierter Lauf). Die sichtbaren Banden wurden mit Anti-Fibrinogen Serum immunpräzipitiert.

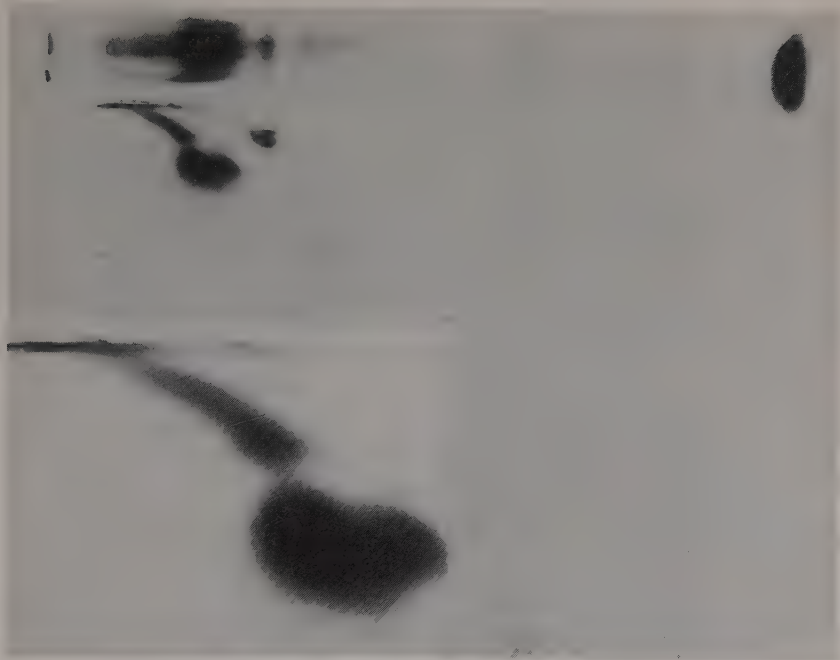


Abb. 5: Zweidimensionale Elektrophorese einer Mischung von Normalplasma mit einem Gerinnsellysat nach 2,5 molarer β -Alanin Fällung in Gelen verschiedener Porengröße (1. Trennrichtung, von links nach rechts, 5 %-iges PAA-Gel; 2. Trennrichtung, von oben nach unten, 7 %-iges PAA-Gel).

Eine Vergrößerung (unten links) zeigt, daß die Komponente, die hinter dem Fibrinogen wandert, nach der zweiten Trennung nicht die Linie zwischen dem Fibrinogen und dem Ausgangspunkt erreicht.

3.) Befunde bei Plasmaproben von Patientinnen

Das Gelverteilungsmuster bei einer Patientin, welche wegen einer Thrombose der Vena femoralis eine Streptokinase Infusion erhielt, ist in Abbildung 6 aufgezeigt. Die Plasmaprobe zeigte nach 24-stündiger Inkubation mit Thrombin eine schwache grobkörnige Gerinnselbildung. Die Menge von FR-Antigen im Serum (3,2 mg/ml) war ungefähr gleichgroß wie die Menge von FR-Antigen im Plasma (3,62 mg/ml). Bei dieser Plasmaprobe konnte man die Thrombinzeit nicht messen, und selbst nachdem man Normalplasma hinzugefügt hatte, betrug die Thrombinzeit noch immer 110 Sekunden. Nach der Immunpräzipitation konnten 3 Präzipitationsbanden klar identifiziert werden. Berücksichtigte man das Wanderungsverhalten, so konnte man sie nach Mader (1971) als X, Y und D identifizieren. Auf dem ungefärbten Gel war eine zusätzliche Präzipitationslinie unterhalb des Transferrins zu erkennen, bei der es sich um Fragment E handeln könnte.

Die Immunpräzipitation der Plasmaprobe einer Patientin, die nach einem septischen Abort im Endotoxinschock verstorben war, und bei der autoptisch disseminierte Fibrinablagerungen gesichert wurden, ließ eine deutlich sichtbare Bande erkennen, welche in geringem Abstand kathodenwärts vom Fibrinogen wanderte (Abb. 7). Außerdem war ein Präzipitationsbogen in Richtung des oberen Endes des Gels sichtbar. Dieses zusätzliche Präzipitat könnte auf denaturiertes FR-Antigen, welches nicht in das Gel eindrang, oder auf eine Wanderungsbande, welche soeben ins Gel eindrang, zurückzuführen sein.

Das Verteilungsmuster gleicht jedoch demjenigen, welches man nach der in vitro Auflösung eines Plasmagerinnsels oder nach der β -Alanin Fällung des Plasmas derselben Patientin beobachten könnte. Es sollte hier darauf hingewiesen werden, daß zu der Zeit, da man die Probe entnahm, der Uterus als die Hauptquelle der Endotoxine bereits entfernt worden war. Zu dieser Zeit befand sich die Patientin in einer späten Phase des Endotoxinschocks. Der Fibrin-Monomer-Test nach Godal und Abildgaard (1966) ergab hier ein negatives Resultat; die Menge des FR-Antigens betrug im Plasma 2,14 mg/ml und im Serum 0,2 mg/ml.

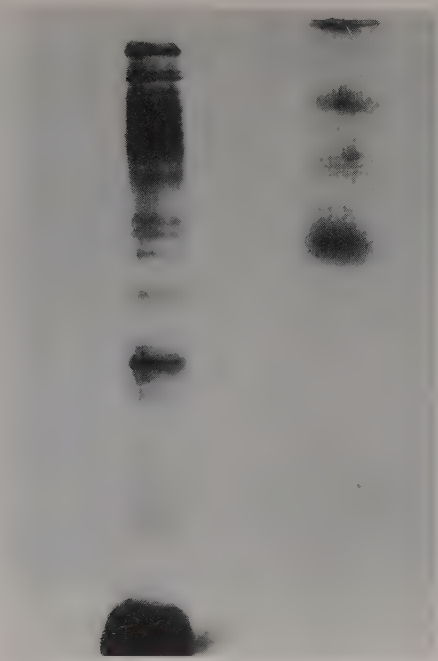


Abb. 6: Immunpräzipitation (rechts) der Plasma-
probe einer Patientin (links) nach
streptokinaseinduzierter Thrombolyse.

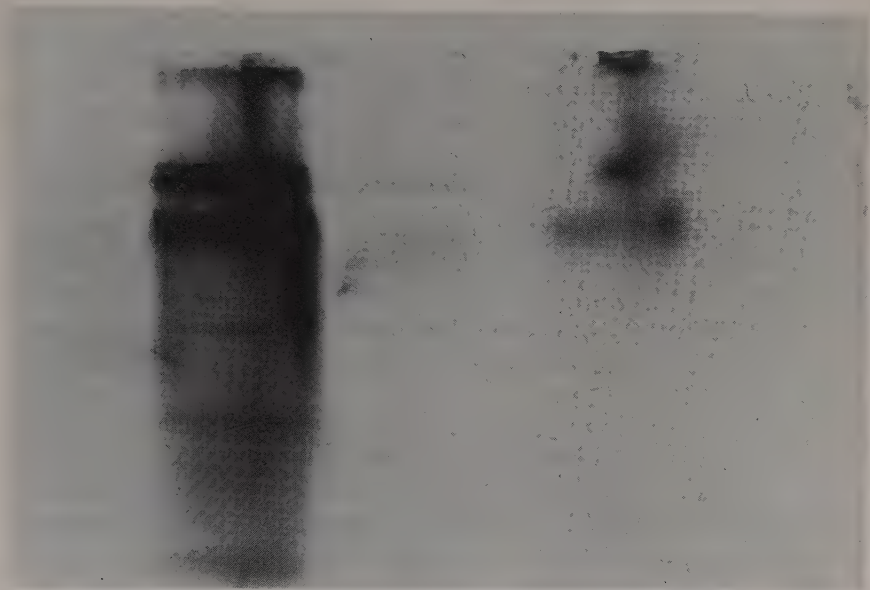


Abb. 7: Immunpräzipitation (rechts) der Plasmaprobe einer Patientin (links), die nach einem septischen Abort im Endotoxinschock verstorben war und bei der autoptisch disseminierte Fibrinablagerungen gefunden wurden. Man beachte die immunpräzipitierte Komponente, die hinter dem Fibrinogen wanderte und den Präzipitationsbogen in Richtung des oberen Endes des Gels.

D) DISKUSSION

Fisher und Mitarbeiter identifizierten 1970 FR-Antigen in Plasmaproben, indem sie eine 15 %-ige PAA-Gelelektrophorese anwendeten und ihr eine Agar-Immundiffusion folgen ließen. Bei unseren Versuchen ergab die 'Intra-Gel-Immunpräzipitation (KRIEG und WEICKER, 1970) ein deutlich erkennbares Verteilungsmuster der betreffenden Wanderungszonen des FR-Antigens im Gel, obgleich die Empfindlichkeit beider Methoden bei einer unteren Grenze von 2 - 3 μ g feststellbaren FR-Antigens pro Bande gleich war.

Plasmaproteine werden durch die PAA-Gelelektrophorese gemäß ihrer elektrophoretischen Mobilität und ihrer Molekulargröße getrennt. Das Wanderungsverhalten der Fibrinogenabbauprodukte wird unter diesen Bedingungen hauptsächlich von ihrer jeweiligen Molekulargröße bestimmt, d.h. Abbauprodukte mit größerem Molekulargewicht wandern langsamer und jene mit niedrigerem Molekulargewicht schneller (MARDER, 1971). Die einzige Ausnahme zu dieser Regel ist das Überlappen der Wanderungszone des Fragments Y mit D (MARDER, 1971).

Wir konnten jedoch unter ganz bestimmten Umständen eine Trennung jener zwei Komponenten beobachten (siehe Abb. 6). Die vorliegende Arbeit demonstriert, daß dieses Wanderungsverhalten auch für die löslichen Plasminabbauprodukte des Fibrins, die ein höheres Molekulargewicht als das des Stammoleküls haben, maßgeblich ist. Indem man die Lyse des Fibrin- oder des Plasmagerinnsels verfolgte, stellte man eine Bande fest, die hinter dem Fibrinogen wanderte (siehe Abb. 1 und 4). Nach einer zweidimensionalen Elektrophorese in Gelen mit derselben Porengröße ergab sich eine diagonale Anordnung der Komponenten.

Dadurch wurden Artefakte, welche sich durch das elektrophoretische Verfahren ergaben, ausgeschlossen. Diese Artefakte hätten durch Interaktion oder durch chemische Veränderungen innerhalb der Komponenten des ersten Versuches oder zwischen diesen und dem Gel selbst hervorgerufen werden können (RAYMOND, 1968). Die zweidimensionale Elektrophorese in Gelen verschiedener Porengröße ließ erkennen, daß die Komponente, welche kathodenwärts vom Fibrinogen wanderte, die Linie zwischen der Fibrinogenwanderungszone und dem Ausgangspunkt des ersten Versuches nicht erreichte. Die PAA-elektrophoretische Trennung unter Verwendung von NDS bestätigte diese Beobachtung. Die langsamer als Fibrinogen wandernde Komponente konnte man unter dieser Voraussetzung, der auf ein Minimum reduzierten natürlichen Ladungsunterschiede, ebenfalls hinter dem Stammolekül lokalisieren. Man darf daher annehmen, daß dieses lösliche Abbauprodukt des Fibrins tatsächlich ein höheres Molekulargewicht als das Fibrinogen hat.

Bei der Wirkung des NDS ist zu diskutieren, inwieweit die beim Ladungsausgleich auftretende Streckung der Peptidketten das Wanderungsverhalten von Fibrinogen und seinen Derivaten beeinflußt. Insofern sind die Versuche in Anwesenheit von NDS nur mit Einschränkung zu verwerten.

Ferner wurden diese Versuche mit nicht isolierten Fibrinogenderivaten durchgeführt. Aus diesem Grunde wäre eine zusätzliche Identifizierung dieser hochmolekularen Plasminabbauprodukte des Fibrinogens mittels einer Überprüfung von gereinigten Derivaten in NDS notwendig.

Es ist jedoch wahrscheinlich, daß die Abbauprodukte mit einem Molekulargewicht über dem des Fibrinogens im PAA-Gel hinter dem Fibrinogen wandern.

Vermeylen und seiner Gruppe gelang es bereits 1971, FR-Antigen mit einem Molekulargewicht, das über dem des Fibrinogens lag, bei Patientinnen mit DIC darzustellen. Man darf wohl annehmen, daß diese Fibrinogenabbauprodukte, welche ein ähnliches Wanderungsverhalten aufweisen wie die Komponenten, die man nach einer in vitro Lyse von Fibrin- oder Plasmagerinnseln beobachtete, tatsächlich lösliche, hochmolekulare Plasminabbauprodukte des Fibrinogens sind. Diese Annahme würde mit den Beobachtungen bezüglich der Auflösung intravaskulärer Fibrinablagerungen in Fällen von DIC beim Menschen (GRAEFF und Mitarbeiter, 1967) und mit entsprechenden Beobachtungen beim Versuchstier (MARGARETTEN und Mitarbeiter, 1964; GRAEFF und Mitarbeiter, 1968) übereinstimmen.

E) ZUSAMMENFASSUNG

Plasmaproteine wurden mit Hilfe der PAA-Gelelektrophorese getrennt und anschließend Fibrin und/oder Fibrinogenabbauprodukte durch Immunpräzipitation mit monovalenten Antiseren direkt im Gel nachgewiesen. Aussagen über molekulare Gewichtsbeziehungen waren nach zweidimensionaler Elektrophorese und nach elektrophoretischer Trennung in Gegenwart von Natriumdodecylsulfat möglich.

- 1.) Die PAA-Gelelektrophorese mit Immunpräzipitation im Gel ermöglichte den Nachweis von Fibrinogenderivaten in Plasmaproben geringen Volumens.
- 2.) Derivate mit einem größeren wie mit einem kleineren Molekulargewicht wurden in vitro und in vivo nachgewiesen.
- 3.) Die Fällung des Plasmas mit 2,5 molarem β -Alanin führte zu einem Ausgangsmaterial, das die Identifizierung hochmolekularer Derivate ohne Immunpräzipitation erlaubte.
- 4.) Bei streptokinasebehandelten Patientinnen wurden Abbauprodukte des Fibrinogens mit einem Molekulargewicht kleiner als das des Fibrinogens beobachtet, wohingegen bei Patientinnen im Endotoxinschock Produkte mit einem Molekulargewicht höher als das des Fibrinogens nachgewiesen wurden.

F) LITERATURVERZEICHNIS

- BELLER, F.K., H. GRAEFF: Equipment and general requirements of the coagulation laboratory. in: Methods and theories of blood coagulation. N. Bang, F.K. Beller, E. Deutsch, E. Mammen, Eds., Academic Press, New York; Thieme, Stuttgart, 1970, p. 57.
- DAVIS, B.J.: Disc-electrophoresis - II, Method and application to human serum proteins. Ann. N.Y. Acad. Sci. 121:404 (1964).
- FISHER, S., A.P. FLETCHER, N. ALKJAERSIG, S. SHERRY: Immunoelectrophoretic characterization of plasma fibrinogen derivatives in patients. J. Lab. Clin. Med. 70:903 (1967).
- GODAL, H.C., U. ABILDGAARD: Gelation of soluble fibrin in plasma by ethanol. Scand. J. Haematol. 3:342 (1966).
- GRAEFF, H., W. KUHN, U. BLEYL: Verbrauchskoagulopathie und Lysekoagulopathie bei menschlichen Aequivalenten des Sanarelli-Schwartzman-Phänomens (generalisiertes Schwartzman-Phänomen). Thromb. Diath. Haemorrh. 17:144 (1967).
- GRAEFF, H., P.S. MITCHELL, F.K. BELLER: Fibrinolytic enzyme system of the kidney related to renal function after infusion of endotoxin in rabbits. Lab. Invest. 19:169 (1968).
- KRIEG, M., H. WEICKER: Die immunologische Identifizierung und Lokalisierung der Proteinfractionen nach disk-elektrophoretischer Trennung auf Polyacrylamidgel. Z. klin. Chem. klin. Biochem. 8:293 (1970).

- KUHN, W., H. GRAEFF: Gerinnungsstörungen in der Geburtshilfe. G. Thieme-Verlag, Stuttgart, 1970.
- MANCINI, G., J.P. VAERMAN,
A.O. CARBONARA, J.F. HEREMANS: A single-radial-diffusion method for the immunological quantitation of proteins. Proceedings XIth Colloquium Protides of the Biological Fluids, Elsevier, Amsterdam, 370 (1964).
- MARDER, V.J.: Identification and purification of fibrinogen degradation products produced by plasmin: considerations on the structure of fibrinogen. in: Fibrinogen Degradation Products. M. Verstraete, J. Vermynen and M.B. Donati, Eds. Scand. J. Haematol. suppl. 13:21 (1971).
- MARGARETTEN, W., H.O. ZUNKER,
D.G. MCKAY: Production of the generalized-Schwartzman-reaction in pregnant rats by intravenous infusion of thrombin. Lab. Invest. 13:552 (1964).
- MAURER, H.R.: Disk-Elektrophorese. Walter de Gruyter & Co., 1968.
- ORNSTEIN, L.: Disc-electrophoresis - I. Background and theory. Ann. N.Y. Acad. Sci. 121:321 (1964).
- RAYMOND, S.: Acrylamide gel electrophoresis. in: Methods in immunology and immunochemistry. C.A. Williams, M.W. Chase, Eds., Academic Press New York, p. 47, 1968.

- SHAPIRO, A.L.: Molecular weight estimation of polypeptide chains by electrophoresis in SDS-polyacrylamide gels. Biochem. Biophys. Res. Commun. 28:815 (1967).
- STRAUGHN, W. III, R.H. WAGNER: A simple method for preparing fibrinogen. Thromb. Diath. Haemorrh. 16:198 (1966).
- VERMYLEN, J., M.B. DONATI, M. VERSTRAETE: The identification of fibrinogen derivatives in plasma and serum by agarose gel filtration. in: Fibrinogen Degradation Products. M. Verstraete, J. Vermynen and M.B. Donati, Eds. Scand. J. Haematol. suppl. 13:219 (1971).

G) LEBENSLAUF

Am 16. August 1947 wurde ich als zweites Kind des Majors i. G. a. D. Heinz Wreschniok und seiner Frau Leonore, geb. Schievelbein, in Heidelberg geboren. Wir wohnten in Edingen bei Heidelberg, wo ich auch die Volksschule besuchte.

Ostern 1958 trat ich in das Bunsengymnasium in Heidelberg ein und legte dort am 7. Oktober 1966 das Abitur ab.

Mein Medizinstudium begann ich an der Universität Heidelberg mit dem Wintersemester 1966/67.

Am 3. August 1967 bestand ich das Vorphysikum, am 18. April 1969 das Physikum.

Das erste klinische Semester absolvierte ich im Sommer 1969 in Kiel. Im Wintersemester 1969/70 studierte ich in Innsbruck.

Seit dem Sommersemester 1970 war ich an der Universität München immatrikuliert, wo ich im Sommer 1972 das Staatsexamen ablegte.

Seit September 1972 arbeite ich als Medizinalassistent an der I. Frauenklinik der Universität München.

Herrn Prof. Dr. med. Josef Zander danke ich für die Überlassung des Themas. Besonders möchte ich mich bei Herrn Priv.-Doz. Dr. med. Henner Graeff bedanken, dessen freundlicher Beratung und Unterstützung ich jederzeit gewiß sein konnte. Auch meinem Freund und Kollegen René von Hugo will ich an dieser Stelle für seine große Hilfsbereitschaft herzlich danken. Für die technische Hilfe im Labor danke ich Frau Irene Moser und Fräulein Gudrun Sassmannshausen.

